

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-069899

(43)Date of publication of application : 14.03.1995

(51)Int.Cl.

A61K 31/70
A61K 48/00
C07K 7/00
C12N 15/09
// C07H 21/04

(21)Application number : 05-241973

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEM CORP

(22)Date of filing : 02.09.1993

(72)Inventor : SEKI MAKOTO
HONDA YOSHIKAZU
YAMADA SUGURU

(54) ANTIVIRAL AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an antiviral agent containing a specific inhibiting substance as an active component, having low side actions and useful for the prevention and treatment of diseases caused by viruses having IRES such as HCV.

CONSTITUTION: This antiviral agent contains, as an active component, a substance to inhibit the bonding of (A) a protein participating in the translation of a virus gene (preferably type-C hepatitis virus gene) by bonding to preferably Yn-Xm unit of the IRES region of the virus gene (Yn is an oligopyrimidine; Xm is a random nucleotide) and (B) the IRES region of the virus gene (preferably a compound forming a hybrid with the oligopyrimidine).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

21.06.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-69899

(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70 48/00	ADY	9454-4C		
C 0 7 K 7/00		8318-4H		
C 1 2 N 15/09	ZNA	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	ZNA A
審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 23 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-241973

(22) 出願日 平成5年(1993)9月2日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 関 誠

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(72) 発明者 本多 喜員

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(72) 発明者 山田 英

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 曉司

(54) 【発明の名称】 抗ウイルス剤

(57) 【要約】

【構成】 ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域に存在する特異的な構造であるIRES (Internal Ribosome Entry Site) 領域に結合して該ウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする抗ウイルス剤。IRES領域を有するウイルスとしては、例えばC型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、脳筋炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトライノウイルス等が挙げられる。

【効果】 本発明の抗ウイルス剤は、HCV等のIRESを有するウイルスに起因するウイルス性疾患に対する予防または治療薬を提供するものである。IRESが関与する翻訳機構は、通常の真核細胞の翻訳系にはほとんど見られない特殊なものであることから、副作用の少ない、極めて選択的な抗ウイルス剤としての利用が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウイルス遺伝子のIRES領域に結合して該ウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする抗ウイルス剤。

【請求項2】 IRES領域の Y_n-X_m ユニット(Y_n はオリゴピリミジンを表し、 X_m はランダムヌクレオチドを表す)に結合してウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする、請求項1記載の抗ウイルス剤。

【請求項3】 Y_n-X_m ユニットまたはその部分配列とハイブリッドを形成する化合物を有効成分とする請求項2に記載の抗ウイルス剤。

【請求項4】 オリゴピリミジンとハイブリッドを形成する化合物を有効成分とする請求項2または3に記載の抗ウイルス剤。

【請求項5】 ウイルス遺伝子がC型肝炎ウイルス遺伝子であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の抗ウイルス剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗ウイルス剤に関し、詳細にはIRESと呼ばれる特異領域を有するウイルスが関与する各種疾患に対する治療または予防薬を提供するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、後天性免疫不全症候群(AIDS)や肝炎に代表されるように、感染性のウイルス疾患が医学上、さらには社会的にも重篤な問題として認識されるようになった。これらのウイルス性疾患を治療する目的で、従来より種々の抗ウイルス剤が開発されてきた。例えばわが国においてはアシクロビル、ピダラビン、ジドブジン(アジドチミジン)、イドクスウリジン、ガンシクロビル、インターフェロン等が販売されている。これらは、大別すると直接ウイルスの酵素の機能を阻害する薬物と、免疫機構を介してウイルスを攻撃する薬物との、大きく2つのタイプに分類される。

【0003】このような抗ウイルス剤の開発は、年々盛んになりつつある。それは、慢性疾患と考えられてきたものが、実はウイルスがその原因であるということが往々にしてあるからである。また高齢化社会が進むに従い、潜伏感染していたウイルスが免疫力の低下した老人で発病する、いわゆる日和見感染の問題も、抗ウイルス剤の需要を喚起する一因となっている。

【0004】ところが従来の抗ウイルス剤は、副作用が強すぎたり、薬剤耐性ウイルスが出現するなど、必ずしも満足いくものが得られていないのが現状であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を鑑みて、従来にない新しい作用機序の抗ウイルス剤を開発するべく検討を重ねてきた。その結果、一部のウイルス遺伝子に見られる特殊な翻訳機構領域、IRES (Internal Ribosome Entry Site)に着目し、この機能を利用することでウイルス蛋白の翻訳を阻害できることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち本発明の要旨は、ウイルス遺伝子のIRES領域に結合して該ウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする抗ウイルス剤に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。本発明において、IRES領域とは、前述のように一部のウイルス遺伝子の5'非翻訳領域(5'UTR)に存在する特異的な構造で、ポリオウイルス、脳筋炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトライノウイルス等のピコルナウイルス科に属するウイルスや、C型肝炎ウイルス(以下、「HCV」と略記することがある)(J. Viro l., 66, 1476-1483 (1992))等に存在する。この構造はステムループに富む複雑な高次構造をとると考えられ、この領域に結合してウイルス遺伝子の翻訳、転写に機能する宿主細胞タンパク質、例えば分子量52K(p52タンパク質)、57K(p57タンパク質)、50Kのタンパク質の存在が確認され(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5846-5850 (1990))、リボソームはこの宿主細胞タンパク質が結合したIRES領域を認識して結合することが知られている(Curr. Top. Microbiol. Immunol., 161, 23-47 (1990); Enzyme, 44, 292-309 (1990))。

【0007】また、Jangらは、ピコルナウイルス5'UTRに存在するオリゴピリミジン(Y_n)とAUGトリプレットを含む Y_n-X_m-AUG ユニット(X_m :ランダムヌクレオチド)がIRESに多く存在すると述べており(in Translationally Regulated Genes in Higher Eukaryotes, 292-309, Basel (1990))、Pilipenkoらは、 Y_n とAUGエレメント間の距離(X_m)が22ヌクレオチド付近であり、この Y_n エレメントがSD配列様の機能を果たしている可能性を示している(Cell, 68, 119-131 (1992))。

【0008】本発明においては、ウイルス遺伝子のIRES領域に結合して該ウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する手段としては、前述のIRES領域に結合してウイルス遺伝子の翻訳、転写に機能する宿主細胞タンパク質とIRES領域との結合を阻害する方法が挙げら

れ、特にIRES領域の $Y_n - X_m$ ユニット (Y_n はオリゴピリミジンを表し、 X_m はランダムヌクレオチドを表す) に結合してウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する方法が挙げられる。従って本発明の抗ウイルス剤は、IRESに対する結合を宿主細胞タンパク質と拮抗する物質や、 $Y_n - X_m$ ユニットとハイブリッドを形成して宿主細胞タンパク質との結合を阻害する化合物などが好適に用いられる。

【0009】以下にHCV遺伝子のIRES領域とハイブリッドを形成して宿主細胞タンパク質との結合を阻害する化合物(以下、「ハイブリッド化合物」と略記する)を提供する場合を例にとり、具体的に説明する。HCVは、1988年5月カイロン社が、従来の伝統的なウイルス探索法とは全く異なる方法により、その遺伝子断片を世界で初めて取得した。

【0010】C型肝炎が発症すると高い確率で急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝癌と移行し、患者を死亡させるが、現在まで、HCVの発現または増殖を抑制する薬剤は見つかっておらず、HCVによるこの病状を治す薬剤の開発が待たれている。HCVの遺伝子は非常に変異しやすく、この変異によって、HCVにはいくつかのサブタイプの異なるものが見出されている。しかしHCV遺伝子のIRES領域は、ピコルナウイルスと同様に5' UTR領域に存在し、この領域はHCVの各サブタイプ間でも特に変異が少ない領域である。よってこの領域との相補鎖を作ることで、ウイルスのサブタイプに関係なくHCVの複製およびHCV遺伝子産物の発現を阻害することができる。

【0011】HCVの遺伝子は1本のRNA鎖から成るとされている。それにコードされているHCV由来蛋白質もまず1本のポリペプチドとして翻訳され、これを前駆体としてHCV遺伝子から生産されるウイルスの構造蛋白質(例えば、コア蛋白など)、RNAポリメラーゼ、プロテアーゼ、ヘリカーゼなどがプロセッシングされながら分かれてできるとされている。すなわち、最初にできる1本のポリペプチドの生産が阻害されれば、ウイルスのプロテアーゼも発現せず、ウイルスのRNAポリメラーゼによるHCVの複製も起こらないと考えられる。最終的には、HCV遺伝子由来蛋白質ができなければ、HCVは増殖しないことになる。

【0012】HCV遺伝子の阻害活性は、例えばHCV遺伝子の5'末端からE2の途中までのmRNAをT7 RNAポリメラーゼ(ストラテジーン社製)を用いて合成し、ラビット赤血球ライセートとイヌのマイクロゾーマルメンブラン(ともにプロメガ社製)を用いたインビトロ翻訳系でHCV由来蛋白を合成し抗HCVコア抗体により免疫沈降させたコア蛋白質の量を測定して、HCV遺伝子からHCV由来蛋白の翻訳活性をみることに、さらにはHCV遺伝子の5'末端から少なくとも

コア蛋白をコードする領域をワクシニアウイルスに挿入して組換えウイルスを作製し、これをヒト由来の細胞株に感染させることによって発現されるHCV由来ポリペプチドの産生量をみることにより測定することができる。

【0013】ハイブリッド化合物としては、デオキシリボヌクレオシド同志を結合しているホスホジエステル結合部のリン原子に二重結合している酸素原子が硫黄原子に置換されたホスホロチオエート型、硫黄原子の代わりにメチル基が導入されたメチルホスホネート型や無置換のホスホネート型、 α オリゴヌクレオシド型など(Crooke, R. M., *Anticancer Drug Des.* (アンチキャンサー ドラッグ デザイン)、6, 606-646, 1991; Tidd, D. M., *Anticancer Research* (アンチキャンサー リサーチ)、10, 1169-1182, 1990)等が使用できる。また、対象とした配列とハイブリッドを形成し、HCV遺伝子と対象とした領域において2本鎖を形成しうるものであれば、ヌクレオシド誘導体でなくても良い。さらに言えば、Antisense research and Development (アンチセンス リサーチ ディベロップメント)、1, 65-113, 1991にChrissey, L. A.によって紹介されたアンチセンスとして使われた総てのアンチセンス化合物も、使用可能である。

【0014】また、ハイブリッド化合物としては、よりDNase抵抗性であることや、mRNAとハイブリッドした時、細胞内のRNaseH活性で相補鎖のRNAを分解できるものが望ましいことも容易に類推できる(Tidd, D. M., *Anticancer Research* (アンチキャンサー リサーチ)、10, 1169-1182, 1990)。また、全てのホスホジエステル結合部がホスホロチオエート型やメチルホスホネート型であるハイブリッド化合物においては、IRES領域とのハイブリッド形成能を上げながらもハイブリッド化合物自体の分解活性をあまり下げない手段として、5'末端側からと3'末端側からの数塩基のホスホジエステル結合をホスホロチオエート型やメチルホスホネート型にして内側の塩基のホスホジエステル結合は修飾しない方法等が挙げられる。

【0015】かかるハイブリッド化合物としては、IRES領域と相補的な配列を有するものであれば特に制限はされないが、好ましくは前述した $Y_n - X_m$ ユニットに相補的な配列を有するもの、より好ましくはオリゴピリミジン領域である Y_n に相補的な配列を有するものであることが望ましい。HCV遺伝子のIRES領域には、オリゴピリミジン領域と推定される部位として、シトシンリッチな領域が見出される(例えば、配列表の配列番号1において33番目のシトシンから38番目のチミンまでの6mer、67番目のシトシンから73番目

のチミンまでの7mer、138番目のシトシンから142番目のシトシンまでの5mer、147番目のシトシンから157番目のシトシンまでの11mer、263番目のシトシンから267番目のシトシンまでの5merなど)。そこでHCVに対しては、ハイブリッド化合物としてグアニンリッチな配列を有するものが特に好ましい。具体的には、配列表の配列番号2~17に示すようなものが挙げられる。

【0016】またかかるハイブリッド化合物は、塩基の長さで表した場合、15merから30merの長さとなるように設計することが望ましい。なお、本発明ではハイブリッド化合物の構造を表すにあたり、便宜上「塩基配列」の形式による配列表として表したが、前述したように、対象とした配列とハイブリッドを形成し、HCV遺伝子のIRES領域において2本鎖を形成しうるものであるならば、必ずしもヌクレオシド誘導体である必要はない。またハイブリッド形成能を損なわない範囲において、一部の配列を任意の塩基、好ましくはプリンに置換しても差し支えない。

【0017】ハイブリッド化合物を培養細胞に取り込ませるには、例えば上記したハイブリッド化合物をそのまま培養液に含ませる等により可能であり、長さが15塩基から28塩基ぐらいのホスホロチオエート型やメチルホスホネート型であればこの条件で容易に取り込ませることができる。また、取り込みを積極的に行わせるために、動物細胞などで盛んに行われているトランスフェクション法（磷酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リボソーム法など）を用いることも好ましい方法の一つである。

【0018】また、人体に投与する場合も、上記ハイブリッド化合物をそのまま静脈に送り込めば、動物実験などからも容易に推測できるように肝臓に半分ぐらいは吸収されると思われる。更に、ハイブリッド化合物の構造や性質によっては、リボソームなどで保護したり、ハイブリッド化合物に細胞を認識できる物質を付加するなどして取り込み効率を上げることもできる。ハイブリッド化合物の製造法およびその評価方法について以下にさらに詳細に述べる。

【0019】(1) mRNA T7N1-19の取得
例えば、プラスミドpUCT71-19（欧州公開特許公報第18313号）をアルカリ法、さらにはCsClを用いた密度勾配超遠心法で調整する。次に、該プラスミドをEcoRI等の制限酵素で完全に切断し、クローンT7N1-19の3'側の1箇所切断された線状DNAを得る。この線状DNA1μg程度を用いて、インビトロトランスクリプションをT7RNAポリメラーゼを用いて行わせることにより、HCV mRNA T7N1-19を約80から100μg得ることができる。この時の反応はストラタジェン(Stratagene)社製のRNA TRANSCRIPTION

Kitを用いてもよいが、T7RNAポリメラーゼの活性条件であれば、別途、試薬を調整し反応させてもよい。得られたmRNAは、ノーザンハイブリダイゼーションで確認できる。プローブはクローンT7N1-19の3'末端領域のDNA断片を用いるラベリング法で調整できる。定量は、波長260nmでの吸光度により計算できる。

【0020】(2) ハイブリッド化合物の合成
例えばアプライド バイオシステム社(Applied Biosystems社)のDNAシンセサイザー394型を用いることにより、ホスホジエステル型のオリゴヌクレオチドもホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドも合成することができる。反応はジメトキシトリチル基ONで行い、HPLCで精製し（目的産物のジステレオマーは全て1つにまとめた）、その後、酢酸処理で目的のハイブリッド化合物を調整できる。

【0021】(3) インビトロ トランスレーション法
を用いたハイブリッド化合物によるHCV由来蛋白合成阻害効果

上記(1)で作成したmRNAを用いてインビトロ トランスレーションを行い、該mRNAにコードされているHCV由来蛋白のIRES活性のもとで発現させる。

【0022】インビトロ トランスレーションは、例えばプロメガ(Promega)社製のウサギ赤血球ライセート、イヌ マイクロゾーマル メンブランを用いる。マイクロゾーマル メンブランはコア蛋白とエンベロープ(E1)の間とエンベロープ(E1)とE2(NS1)の間をシグナルペプチダーゼで切断させるのに必要と考えられる。翻訳されたポリペプチドには[³⁵S]メチオニンが取り込まれる。抗HCVコア抗体によりHCVコア蛋白質を含むポリペプチドを免疫沈降させ、これをSDS-PAGE電気泳動させて、富士写真フイルム社製バイオイメージアナライザー BAS2000(BIO-IMAGE ANALYZER)等を用いることにより解析することができる。

【0023】ハイブリッド化合物は、mRNAとインビトロ トランスレーション用試薬が混ざる直前にインビトロ トランスレーション試薬に混ぜ、翻訳阻害効果を見ることが好ましい。その結果、HCV遺伝子配列から設計しうる長さ15塩基から30塩基以下のハイブリッド化合物が阻害効果に深く関わっていることが確認される。

【0024】(4) 組換えワクシニアウイルスを用いた細胞評価系における、ハイブリッド化合物によるHCV遺伝子の翻訳阻害効果

外来遺伝子の両端にワクシニアウイルス中の特定部位の配列を連結したものは、かかる部位とワクシニアウイルス遺伝子中の対応配列との間に相同性組換えが起こることが知られている。この方法を用いてHCV遺伝子を導入した組換えワクシニアウイルスを作製し、これを適当

な細胞に感染させることにより細胞中でHCV遺伝子を発現させることができるので、翻訳されるHCVタンパクをアッセイする適当な評価系を構築することにより、ハイブリッド化合物による翻訳阻害効果を測定することができる。

【0025】具体的には、後述の実施例に示すように、HCV由来の遺伝子をワクシニアウイルスのヘマグルチニン(HA)遺伝子中に挿入する。HAはワクシニアウイルスの増殖に必須ではない。またHA遺伝子の機能が失われた場合、そのようなワクシニアウイルスを血球凝集機能の喪失として、ニワトリ赤血球によるウイルスブランクの染色等により同定することができることから、外来遺伝子の挿入部位として好適に使用される。しかしかかる部位としては、外来遺伝子の挿入によりウイルスの増殖が本質的な影響を受けず、しかも外来遺伝子が挿入されたウイルスの簡単な同定を可能にする部位であるならば、特に制限はされない。挿入するHCV由来の遺伝子としては、HCV由来のものであり、5'側の非翻訳領域にあるIRES領域を含む遺伝子であることが必要である。前述したように、HCV遺伝子がコードするポリペプチドはまず約3,000アミノ酸からなる1本のポリペプチド(前駆体タンパク質)として翻訳され、これがプロセッシングを受けて各機能タンパクができることとされている。前駆体タンパク質はN末端側からコア蛋白、E1(エンベロープ)蛋白、E2(NS1あるいはエンベロープ2)蛋白などがこの順で続いているので、HCV遺伝子の構成も5'末端側から非翻訳領域、コア蛋白をコードする遺伝子、E1蛋白をコードする遺伝子等と続く。よってHCVポリペプチドの翻訳阻害効果を測定するためには、正常にHCV由来ポリペプチドが産生される必要があるので、挿入するHCV由来の遺伝子は5'側非翻訳領域にあるIRES領域を含み、かつその3'側に続くコア蛋白をコードする遺伝子を少なくとも含む遺伝子でなければならない。具体的には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列において、5'末端の25~30番目から910bp程度の長さの塩基配列で表される遺伝子が挙げられる。この場合、コア蛋白が発現されればウエスタンブロッティングにより約22KDaの蛋白として確認することができる。

【0026】かかるHCV由来の遺伝子は、その5'上流側にプロモーターを連結してpUC19等のベクターに挿入される。プロモーターとしては、ワクシニアウイルス内で機能するものであれば特に制限はされない。好ましくは、ワクシニアウイルス由来のearlyプロモーターで、高発現のプロモーターが使用される。具体的には、ワクシニアウイルス由来の7.5kプロモーター(Cell, 125, 805-813, 1981)、もしくはこれに点変異を導入して改変したもの(J. Mol. Biol., 210, 749-769, 1988)等が挙げられる。また発現量を増強させる目的で、配列

表の配列番号27に示すような合成DNAを前記プロモーターと組み合わせて使用することも好ましい態様の一つである。また、HCV由来遺伝子の3'側にルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を挿入しておくと、この融合遺伝子が翻訳されて融合蛋白が発現される。融合蛋白はHCV由来ポリペプチドとレポーター遺伝子がコードするポリペプチドとが融合されたものであることから、適当な条件下でプロセッシングをかけてレポーター遺伝子がコードするポリペプチドを測定することにより、間接的にHCV由来ポリペプチドを測定することができる。HCV遺伝子には、コア蛋白とE1蛋白とをプロセッシングするシグナル配列が存在する。従って、HCVコア蛋白の翻訳阻害効果を測定する場合は、このシグナル配列を利用してコア蛋白のC末端が切断されるように設計することが望ましい。ベクターの構築は、常法に従って行うことができる。

【0027】かくして得られるトランスファーベクターから、ベクターDNAを常法に従って調製し、このDNAとワクシニアウイルスの野生株とを混合することによって相同性組換えを行わせる。こうして得られた組換えワクシニアウイルスを、例えばヒト由来の細胞株に感染させる。この感染細胞中に組換えタンパクが発現されるので、感染細胞の培養物から常法に従ってタンパク成分を得、ウエスタンブロッティング等によりHCV由来のポリペプチドを測定することができる。

【0028】ハイブリッド化合物は、組換えワクシニアウイルスを細胞株に感染させる前及び/又は後に添加される。対象としてハイブリッド化合物を加えないときの組換えHCV由来ポリペプチドの産生量、又はIRES領域の相補鎖とホモロジーの低い、すなわちハイブリッドをほとんど形成しない化合物を加えたときの組換えHCV由来ポリペプチドの産生量等と比較を行うことにより、ハイブリッド化合物の翻訳阻害効果を求めることができる。

【0029】かかるハイブリッド化合物を抗ウイルス剤として使用する際には、当該化合物を経口により、または静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等の注射剤として、さらには坐剤中に封入して用いることもできる。このとき、必要に応じて薬学的に許容され得る担体を常法に従って調製・含有させることもできる。ハイブリッド化合物の投与量に関しては、アンチセンス化合物においてアメリカのバイオベンチャー会社をはじめ多くのグループから論文や学会などで発表され、それらによると培養細胞(動物細胞)などで10から100 μ Mで効果を示すアンチセンス化合物は、人体においてもある程度の効果を示すという例がHIV患者などの難治病患者に対して得られている。従って本発明においても、ハイブリッド化合物を1日あたり100 μ M以下、好ましくは0.1~50 μ Mの濃度となるように使用することが好ましい。なお言うまでもないが、かかる投与量は患者の

年齢、病態、症状等により適宜増減される。

【0030】以上、対象とするウイルスがHCVの場合を例にとり具体的に説明を行ってきたが、本発明の抗ウイルス剤はIRESと呼ばれる特殊な翻訳機構領域をそのウイルス遺伝子内に有するものであれば、いずれのウイルスにおいても抗ウイルス効果を発揮することができる。具体的には、HCVの他に小児麻痺の原因となるポリオウイルス(PV)、脳筋炎の原因となる脳筋炎ウイルス(EMCV)、口腔(咽頭粘膜)に特有の水疱や口内疹を作る口蹄疫ウイルス(FMDV)、鼻かぜを引き起こしたり上部気道の粘膜などに自然感染するヒトライノウイルス(HRV)等のピコルナウイルスが関与する各種の疾患に対する有効な予防、または治療薬となり得る。なおピコルナウイルス科に分類されるウイルスにおいては、IRES領域のオリゴピリミジンとして通常ポリUの存在が認められる。従ってピコルナウイルス科に属するウイルスを標的としたハイブリッド化合物を提供する場合には、該ポリUとハイブリッド形成能の高い化合物、具体的にはポリA等のアデニンリッチな配列を有するものが好適に使用される。

【0031】

【発明の効果】本発明の抗ウイルス剤は、ウイルス遺伝子の特殊な翻訳機構に着目した新規な思想に基づくものであり、HCV等のIRESを有するウイルスに起因するウイルス性疾患に対する予防または治療薬を提供するものである。IRESが関与する翻訳機構は、通常の真核細胞の翻訳系にはほとんど見られない特殊なものであることから、副作用の少ない、極めて選択的な抗ウイルス剤としての利用が期待される。

【0032】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0033】参考例1 mRNA T7N1-19の取得

配列表の配列番号1に示すクローンT7N1-19を、pUC19のクローニングサイトに持つpUCT7119(欧州公開特許公報第518313号)をアルカリ法、さらにはCsClを用いた密度勾配超遠心法(モレキュラー クローニング、2nd edition、1.33-1.52、1989)で該プラスミドDNAを約100 μ g調整した。

【0034】この高純度に精製された該プラスミド10 μ gを制限酵素EcoRIで完全に切断し、クローンT7N1-19の3'側の1箇所切断された線状DNAを得た。該線状DNA1 μ gを40mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM DTT、50 μ g/ml BSA、2mM 各NTP、40mM MgCl₂、1mM スペルミジン、RNase インヒビター、50 unit およびT7RNAポリメラーゼ、1.42 μ g

からなる組成の反応溶液50 μ lで反応を開始した。37℃で20分後、T7RNAポリメラーゼ 10ユニットを加え、さらに37℃で20分インキュベーションした。最後にDNase I(Stratagene社製)を10ユニット(1 μ l)加え、30℃で10分インキュベーションし、この反応溶液にフェノール・クロロホルム溶液(フェノール:クロロホルム=1:1)50 μ lを加え反応を止め、混和後、水相50 μ lを回収し、いわゆるエタノール沈殿を行うため、3M酢酸ナトリウム(pH5.5)を5.5 μ lを混和して、さらにエタノール約150 μ lを混和して、15000rpm 15分間遠心し、得られたRNA(転写物)を乾燥させた。

【0035】得られたRNAは、30 μ lのDEPC処理された滅菌水(モレキュラー クローニング、2nd edition、7.26、1989)に溶解され、そのうち3 μ lは、波長260nmの吸光度を測定し、1OD=40 μ g/mlとして計算し、定量した。この定量値より、得られたRNA量は約80 μ gであった。また、転写物の長さを見るため、ホルムアミドを用いたアガロース電気泳動(モレキュラー クローニング、2nd edition、7.43、1989)を行った。その結果、得られたRNAは、シングルバンドで、しかも長さも分子量マーカー(GIBCO BRL社製:0.24-9.5Kb RNA Ladder)と比較し妥当なものであった。また、この電気泳動後のアガロースをメンブランに転写し、いわゆるノーザンハイブリダイゼーション(モレキュラー クローニング、2nd edition、7.39-7.52、1989)を行い、転写物のRNAが確かにクローンT7N1-19由来であることも確認した。この時、用いたプローブはクローンT7N1-19の3'領域のクローンN19の配列を持つDNA断片より、ラベリング法により(モレキュラー クローニング、2nd edition、10.13-10.17、1989)作成した。

【0036】参考例2 HCV由来蛋白質のインビトロでの合成とその解析

参考例1で合成した転写物であるmRNA T7N1-19は、1本鎖RNAであるHCVゲノム遺伝子(欧州公開特許公報第518313号)の5'領域側、2007塩基とほぼ同じ構造を持っている。異なるのは、HCV遺伝子の5'側にT7RNAポリメラーゼに作用するT7のプロモーター増強配列を5'末端に付加している事である。

【0037】インビトロ トランスレーション反応は、ウサギ赤血球ライセート(Promega社製)11.375 μ l、イヌ マイクロゾーマル メンブラン(Promega社製)1.17 μ l、アミノ酸ミックス(Promega社製)5.2 μ l、L-[35S]-メチオニン(Amersham社製)1.3 μ l(729

KBq) およびRNase インヒビター (宝酒造社製) 0.2 μ l と混ぜ、最終量 14.37 μ l として、該転写物 約 3.5 μ g に加えて反応を開始した。基本的には、プロメガ (Promega) 社の「Translation invitro Technical Manual」のプロトコールに従って反応させた。

【0038】また、試薬のロットチェックを兼ねてRNA (転写物) のみを除いた系で反応させ、何も合成されないことを確認した。また、コントロールとして、E. coli β -lactamase mRNA (Promega 社製のイヌ マイクロゾーマル メンブランに添付) 0.5 μ g を、該転写物 約 3.5 μ g の代わりに用いた。

【0039】30℃で1時間15分インキュベーション後、そのままSDS-PAGE電気泳動すると、1レーンあたりの蛋白量が多すぎて合成された蛋白質の解析が困難となることが予想されたので、免疫沈降法でHCVコア蛋白質を含むポリペプチドのみを分離させ、電気泳動させた。すなわち、翻訳反応溶液全量に対して最終濃度0.5% SDSになるように2.5% SDSを加えた。さらに、4倍量のRIPAバッファー1 (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.15M NaCl および 50mM Tris-HCl (pH7.5)) を加え、反応液を氷上で冷やした後、抗HCVコア抗体 (ラビット血清より精製、ポリクローナル抗体、1 μ g/1 μ l) 1 μ l を加え、1時間、0℃で静置。さらにザイソルビン (ザイメット社製、10% W/V) 3.125 μ l を加えて1時間、0℃で静置。その後、3000 rpm 3分で遠心し、RIPAバッファー2 (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15M NaCl および 50mM Tris-HCl (pH7.5)) 100 μ l を加えて洗浄し、同じ操作をRIPAバッファー3 (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.5) および 1mg/ml BSA) 100 μ l で繰り返し、最後にもう1度RIPAバッファー2で洗浄した。得られた沈殿をSDSローディングバッファー (9.1% Tris-HCl (pH6.8), 16.1% (v/v) グリセリン, 4.2M ウレア, 3.15% SDS, 12.7% (v/v) β -メルカプトエタノールおよび 0.04% BPB) 8 μ l でサスペンションした。

【0040】次に、これらの試料を95℃、5分間煮沸した。このようにして得られた試料8 μ l を、0.1% SDS-15.0% ポリアクリルアミドゲル (70 \times 85 \times 1mm) に添加した。その際、マーカータンパク質としてAmersham社製「Rainbow [¹⁴C] methylated protein molecule

weight markers」(分子量レンジ14300から200000) を使用した。電極液としてトリス緩衝液 (25mM トリス (pH8.3), 192mM グリシンおよび 0.1% SDS) を用い、30mAの定電流で45分間泳動後、ワットマン3MMの紙の上にのせ、透明のラップフィルム (サランラップ) を上からかぶせてゲルドライヤーでゲルを乾燥させた。乾燥されたゲルは富士写真フィルム社製イメージングプレート (TYPE BAS-III) にはさんで、指定のカセットに入れ (この操作は富士写真フィルム社製バイオイメージアナライザー BAS2000 (BIO-IMAGE ANALYZER) のプロトコールに従った)、約12時間室温放置した。イメージングプレートをバイオイメージアナライザーで解析することにより、³⁵SメチオニンにラベルされたHCV由来コア蛋白約22KDaとその前駆体蛋白質 (555アミノ酸からなるポリペプチド) 約61KDaがシャープなバンドとして検出された。

【0041】参考例3 ハイブリッド化合物の合成
アプライド バイオシステム社 (Applied Biosystems 社) のDNAシンセサイザー394型で、ホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチドを合成した。添付のプロトコールに従って、合成中に付加された塩基の保護基をはずして、さらにHPLCによって目的の長さのホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチドを精製した。これは、ホスホジエステル型と違い1ピークに分離されないが、目的とするホスホロチオエート型ジエステレオマーは全てまとめて1ロットとした。その後、5'末端の水酸基についている保護基 (ジメトキシトリチル基) を常法により酢酸水溶液で脱保護し、さらにフェノール処理をした後波長260nmでの吸光度により定量して調整して、目的のハイブリッド化合物を得た (この時、1OD=35 μ g/ml として換算された)。

【0042】実施例1 組換えワクシニアウイルス rV V5CLの作製

【1】組換えワクシニアウイルス作製用トランスファクターの作製

特開昭63-63380号公報の実施例1に記載の方法に従い、ワクシニアウイルスWR株よりHA蛋白遺伝子を精製した。すなわち、ワクシニアウイルスWR株のウイルスを精製し、50mM Tris-HCl (pH7.4) (1mM

【0043】EDTA及び0.5% ドデシル硫酸ナトリウム含有) 中に懸濁し、プロテイナーゼKを250~1000 μ g/mlに加えて37℃にて一夜インキュベートした後、緩衝液で飽和されたフェノール:クロロホルム (1:1) で3回抽出し、そしてエタノールによりウイルスDNAを沈殿させた (エタノール沈殿とは、水相に10分の1量の3M酢酸ナトリウムもしくは等量の

4 M酢酸アンモニウムと水相の2.5倍容のエタノールを加え混和し、半径5 cm程度のロータを用いて15,000 rpm, 4℃で15分間冷却遠心を行い、その沈殿を乾燥させる処理。以下同様)。このDNAを10 mM

Tris-HCl (pH 8.0) (1 mM EDTA 含有) に溶解し、Hind IIIにより消化し、アガロースゲル電気泳動により約50 kbのHind III A断片を単離した。このHind III A断片を、高塩濃度緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.5)) 中でSal Iにより消化し、Hind III A断片の3'末端に存在する約1.8 kbのHind III-Sal I断片を、アガロース電気泳動により単離した。このDNAをT4 DNAポリメラーゼで平滑末端とした。さらにこのDNAをライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて、マルチクローニングサイト内にあるHind III及びEcoRIで消化し、さらにT4 DNAポリメラーゼで平滑末端としたpUC19クローニングベクターに組み込んだ。

【0044】また、特開昭63-63380号公報の実施例4に記載の方法に従いワクシニアウイルスWR株より7.5 k蛋白質プロモーター断片を精製した。すなわち、上記のように調製したウイルスDNAを高塩濃度緩衝液中でSal Iにより消化し、アガロース電気泳動により分離することにより、約0.9 kbのSal I断片を得た。他方、プラスミドpUC18を高塩濃度緩衝液中でSal Iにより消化し、フェノール抽出及びエタノール沈殿により分離することにより、線状プラスミドを得た。次に、前記約0.9 kbのSal I断片と線状プラスミドとをライゲーション緩衝液 (6 mM Tris-HCl, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT (pH 7.6)) 中でT4 DNAリガーゼにより連結し、この反応混合物を用いて大腸菌JM103株を形質転換した。形質転換クローンからのプラスミドをSal Iにより消化することにより切り出した上記DNA断片をRsa I、Alu I、Hap II及びDde Iで消化してスクリーニングすることにより、プラスミドp0901を得た。このプラスミドを中塩濃度緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.5)) 中でRsa I及びHinc IIで消化し、アガロース電気泳動で分離することにより、0.26 kbからなる平滑末端のRsa I-Hinc II断片を得た。かかる断片中に、7.5 k蛋白質プロモーターが含まれる。このDNAをライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて、マルチクローニングサイト内にあるHinc IIで消化したpUC19クローニングベクターに組み込んだ。

【0045】上記のライゲーションに用いたベクターDNAとしては、次の様に用意されたものを5 ng~10

ng使用した。即ち、pUC19クローニングベクターを制限酵素Hind III及びEcoRI、またはHinc II (東洋紡績社製) で切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させた後、さらにアルカリフォスファターゼ (ペーリンガー・マンハイム社製) で5'末端を脱リン酸化して [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Lab. Press)]、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿させた。

【0046】この様にして作成したDNAを用いて大腸菌JM109を形質転換させた (この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものをを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ (COMPETENT HIGH) のプロトコールに従った。このようにして得られた組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い

[モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Lab. Press)]、pUCのマルチクローニングサイトにあるEcoRI側にHA蛋白遺伝子の5'側があるプラスミドを選択し、pUCHAと命名した。また、7.5 kプロモーターの5'側がpUC19のマルチクローニングサイトにあるHind III側にくるようなプラスミドを選択し、pUC7.5と命名した。

【0047】このようにして得られた形質転換体pUCHA及びpUC7.5からそれぞれプラスミドDNAを調製し、デュボン社製蛍光シークエンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。シークエンスプライマーとして次の2種の合成プライマー5' d (GTAAACGACGGCCAGT) 3' (配列表の配列番号20)、5' d (CAGGAAACAGCTATGAC) 3' (配列表の配列番号21) を用いた。

【0048】次に、pUC7.5プラスミド1 µgを制限酵素Sma Iで切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させ、さらにアルカリフォスファターゼ (ペーリンガー・マンハイム社製) で5'末端を脱リン酸化して [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Lab. Press)]、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿させた。このようにして得たDNA10 ngに、合成リンカー5' d (pCAGATCTGCAAGCTTG) 3' (配列表の配列番号22) 5 ngをライゲーションキット (宝酒造社製) を用い挿入した。この様にして作成したDNAを用いて大腸菌DH5を形質転換させた (この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものをを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ (COMPETENT HIGH) のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から、常法によりミニス

クリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、上記の合成リンカーが7.5kプロモーターと順方向にBglII、HindIIIとなるように組み込まれたプラスミドpUC7.5GHを得た。

【0049】このプラスミドを用いてSaikiらの方法〔ネイチャー(Nature), 324, 126, (1986)〕に準じて、いわゆるPCR法により特異的配列を持つDNAを増幅し、7.5kプロモーターの改変を行った。即ち、プラスミドpUC7.5GH10ng、10×PCR緩衝液(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1%ゼラチン) 10μl、1.25mM 4dNTP 16μl、合成DNAプライマー5' d (CAGGAAACAGCTATGAC) 3' (配列表の配列番号23) 及び5' d (GAATAGTTTTTCAA TTTTACG) 3' (配列表の配列番号24) 各(20μM) 5μl、または5' d (CGTAAAAA TTGAAAAA ACTATTC) 3' (配列表の配列番号25) 及び5' d (GTAAAAACGACGGCCA GT) 3' (配列表の配列番号26) 各(20μM) 5μl、に水を加えて合計が100μlになるようにして、まず95℃に5分間保温後、0℃に急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/μl、AmpliTaQ™宝酒造社製) 0.5μlを加え混和後、ミネラルオイルを重層した。このサンプルを、パーキン エルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95℃1分、48℃1分、72℃1分で30回処理した。最後に72℃で7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、それぞれ250bpと110bpの2本の増幅DNA断片を得、5%アクリルアミドゲルで精製した。次に、このようにして得たDNA断片各5ng、10×PCR緩衝液(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1%ゼラチン) 10μl、1.25mM 4dNTP 16μl、合成DNA 5' d (CAGGAAACAGCTATGA

C) 3' (配列表の配列番号23) 及び5' d (GTAAAAACGACGGCCAGT) 3' (配列表の配列番号26) 各(20μM) 5μl、に水を加えて合計が100μlになるようにして、まず95℃に5分間保温後、0℃に急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/μl、AmpliTaQ™宝酒造社製) 0.5μlを加え混和後、ミネラルオイルで重層した。このサンプルを、パーキン エルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95℃1分、48℃1分、72℃1分で30回処理した。最後に72℃で7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、330bpの増幅DNA断片を得、制限酵素EcoRI及びPstIで消化し、5%アクリルアミドゲルで精製した。このようにして得られたDNA断片5ngをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いマルチクローニングサイト内にあるEcoRI及びPstIで消化したpUC19クローニングベクターに組み込み、大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものをを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ(COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、ワクシニアウイルスの強力プロモーターを持つプラスミドpUCSPを得た。該プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入されたDNA断片はデュボン社製蛍光シークエンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。

【0050】このようにして得られたプラスミドpUCSPのBamHI及びBglIIサイトに第40回日本ウイルス学会総会演説抄録4075に記載のプロモーターを両端がBamHI及びBglIIサイトとなるようにした合成DNA(配列表の配列番号27)

【0051】

【表1】

```

5' d (GATCCAAAAATTGAAAAACTAGTCTAATTTAT
3' (GTTTTTAACTTTTTTGATCAGATTAAATA
TGCACGGA) 3'
ACGTGCCTCTAG) 5'

```

を常法により挿入し(ライゲーションには、宝酒造社製のライゲーションキットを用い、方法は宝酒造社のライゲーションキット用のプロトコールに従った)、大腸菌DH5を形質転換しミニスクリーニングにより順方向に合成DNAが6個タンデムに挿入されたプラスミドpUCSEを得た。

【0052】このようにして得られたプラスミドpUCSEを制限酵素PstI及びEcoRIで切断し、フェ

ノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させ、さらにT4 DNAポリメラーゼで平滑端とした後、550bpの断片を5%アクリルアミドゲルで精製した。このようにして得られたDNA断片5ngを制限酵素NruIで消化したプラスミドpUCHA10ngとライゲーションし、大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものをを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ

(COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から、常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)

〕、HA遺伝子と順方向にワクシニアウイルスプロモーターが挿入されたプラスミドpHASEを得た。該プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入されたDNA断片はデュボン社製蛍光シークエンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。決定されたDNA配列は該プラスミドのマルチクローニングサイトのSalIサイトからHindIIIまでを配列表の配列番号30に示す。

【0053】次に、HCV遺伝子の5'端からコア蛋白遺伝子までをPCR法で増幅した。即ち、欧州公開特許公報第5・18313号に記載の実施例28の〔2〕、クローンT7N119のDNA5ng、10×PCR緩衝液(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1%ゼラチン) 10μl、1.25mM 4dNTP 16μl、合成DNA5'd(CGAAGCTTGCCAGCCCCCTGATGGG)3'(配列表の配列番号28)及び5'd(CCGGATCCCGGAAGCTGGGATGGTCAAC)3'(配列表の配列番号29)各(20μM)5μl、に水を加えて合計が100μlになるようにして、まず95℃に5分間保温後、0℃に急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/μl, AmpliTaq™宝酒造社製)0.5μlを加え混和後、ミネラルオイルを重層した。このサンプルを、パーキン エルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95℃1分、58℃1分、72℃1分で30回処理した。最後に72℃で7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、910bpの増幅DNA断片を得、制限酵素HindIII及びBamHIで消化した後、5%アクリルアミドゲルで精製し、ルシフェラーゼアッセイ用のピッカジーン™カセットベクター(東洋インキ製造株式会社)のHindIII及びBamHIサイトに挿入した。ミニスクリーニングによりルシフェラーゼ遺伝子の5'上流にC型肝炎ウイルス遺伝子の5'端からコア蛋白遺伝子までが順方向に挿入されたプラスミドpCS5CLを得た。

【0054】次に、プラスミドpCS5CLを制限酵素EcoRIで部分消化後、制限酵素HindIIIで完全消化し、2.6kb断片をアガロースゲルより切り出し精製した。この断片をプラスミドpHASEのHindIII及びEcoRIサイトに挿入し、ミニスクリーニングによりワクシニアウイルスHA蛋白遺伝子中にワクシニアウイルスプロモーター、HCV遺伝子の5'端からコア蛋白遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子の順に並

んだプラスミドpHA5CLを得た。

【0055】〔2〕組換えワクシニアウイルスrVV5CLの作製

アフリカミドリザル腎由来細胞CV-1(理化学研究所細胞開発銀行RCB0160)を3.5cmシャーレにセミコンフルエントに培養したものに、ワクシニアウイルスLC16m0株(臨床とウイルス, 3(3), 229-235, 1975)をMOI(multiplicity of infection)=0.1PFU/Cellで1時間室温で吸着させた。また、〔1〕で作製したプラスミドpHA5CLを、Maniatisらの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、86頁~96頁(1982))に従い組換え大腸菌から回収、精製しトランスファーベクターpHA5CLDNAを大量に得た。このようにして得たpHA5CLDNA10μgをリポフェクション(Lipofectin、ライフテクノロジー社製)30μlとOpti-MEM培地(ライフテクノロジー社製)170μl中で混合し、室温で10分静置しトランスフェクション液とした。

【0056】次にシャーレからウイルス液を除き、Opti-MEM培地で細胞を2回洗浄した後、先述のDNAを混合したトランスフェクション液にOpti-MEM800μlを加えたものをシャーレに入れ、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。4時間後培地を除き10%ウシ胎児血清を含むMEM培地をシャーレに加えた。さらに、2日間37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した後、この感染細胞を3回凍結融解し、ウイルスを回収した。

【0057】このウイルス液には1mlあたり約10⁸個のウイルスが含まれており、またそのうちの約0.1%が組換え体である。組換えウイルスを単離するためにブランク単離法を用いた。その方法は以下の通りである。ウイルス液を10⁵倍に希釈した。予め10cmシャーレに1枚当たり2×10⁶個のウサギ腎由来細胞RK-13(理化学研究所細胞開発銀行RCB0183)細胞をまき、培養したものを用意し、培地を完全に除いた後、10⁵倍に希釈した液を一枚のシャーレあたりそれぞれ1mlずつ加えた。細胞の乾燥を防ぐため、シャーレを15分おきに傾けてウイルス液が全面に行き渡るようにした。このようにして室温で1時間ウイルスを吸着させた後、2%ウシ胎児血清を含むMEM培地をシャーレに加え、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。

【0058】2日後、培地を除きウイルス液を完全に吸い取り、1%ニワトリ赤血球液をシャーレ1枚あたり3mlずつ静かに加え室温で1時間吸着させた後、完全に吸い取った。ニワトリ赤血球を吸着しないブランクをチップで吸い取り、1mlPBS中でピペッティングして組換えウイルスを浮遊させた。これら一連の操作(感染

24wellプレートに約60%コンフルエントのヒト

肝臓細胞由来WRL 68を10%ウシ胎児血清を含むTS-2培地で培養したものに組換えワクシニアウイルスrVV5CLを2%ウシ胎児血清含むPBSに均一に混和し、MOI=0.01PFU/Cellで1時間室温で吸着させた。その後、すぐにOpti-MEM培地500 μ lで2回洗浄し、ハイブリッド化合物を添加したOpti-MEM培地500 μ lを加えて16時間、37℃、5%CO₂ インキュベーターで培養した。実施例1の〔3〕で記述したように、感染細胞は培地を除いた後、ピッカジーン細胞溶解液500 μ lを加え、室温で30分放置され、よく混和された後、該基質発色液80 μ lへ8 μ lを混和し、10秒後に、ベルトールドジャパン社製MULTI-BIOLUMAT LB9505Cで27℃、2.5分間、測定した。検量線を書くために、1%BSAを含むPBSで希釈されたルシフェラーゼを10⁻¹⁵、10⁻¹⁶、10⁻¹⁷、10⁻¹⁸、10⁻¹⁹ mol/ μ lに調製しスタンダード試薬として用いた。このスタンダード試薬を上記のように該基質発色液80 μ lへ8 μ lを混和し、測定した。

【0066】スタンダード試薬のルシフェラーゼ濃度の常用対数とその測定値（蛍光の積算値）の常用対数が1次関数として直線に乗るので、これを検量線とした。感染細胞中に発現されたルシフェラーゼの量は、測定値（蛍光の積算値）に対応する蛋白量を検量線から求めた。このようにして得られたルシフェラーゼの量は、HCV由来コア蛋白とルシフェラーゼの融合蛋白遺伝子からの該融合蛋白発現量として評価した。

【0067】該遺伝子のIRESの予測には、5' 非翻訳領域からHCV遺伝子のエンベロープ1領域付近（配列表の配列番号1に示す塩基番号で1から1200番に相当する）のRNAの配列から2次構造を解析プログラムFOLD (UWGCG Software, Uni

v. Wisconsin) によって解析し、参考にした。

【0068】結果を図2に示す。これらのハイブリッド化合物は、感染細胞の培地に最終濃度が5 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ Mとなるような条件で添加した。1回に全く同じ条件で細胞に感染させ、アッセイできる検体数には限りがあるので、1度に用意した24wellプレートの枚数は、操作上、実験条件がずれない程度の範囲を考慮して、最大6プレートとした。ハイブリッド化合物の濃度の種類数は、このことから制限されたので、毎回必ずハイブリッド化合物を入れないウェル（標準は4ウェル）を作り、また効果のない対照の化合物（前記表2）も対象として必ず入れて指標とした。細胞密度やインフェクション時間、インフェクション後の培養時間の条件において若干異なったが、5 μ Mで行った実験においては、SMS38についてのルシフェラーゼの発現量が、効果の殆どない化合物（SMS39およびSMS41）に対して約5分の1にまで減少させた。また、SMS38においては、用量依存的にルシフェラーゼの発現量を減少させることも確認された。

【0069】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2033

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

アンチセンス：No

トポロジー：直鎖状

起源：Hepatitis C virus

直接の起源

クローン名：T7N1-19

配列

```

ACTAGTTAAT ACGACTCACT ATAGGCTGCC AGCCCCCTGA TGGGGGCGAC ACTCCACCAT 60
AGATCACTCC CCTGTGAGGA ACTACTGTCT TCACGCAGAA ACGCTCTAGC CATGCCCTTA 120
GTATGACTGT CGTGCAGCCT CCAGGACCCC CCTCCCGGG AGAGCCATAG TGCTCTGCGG 180
AACCGCTGAG TACACCGCAA TTGCCAGGAC GACCGGGTCC TTTCTTGGAT CAACCCGCTC 240
AATGCCTGGA GATTGGGGCG TGCCCCCGCG AGACTGCTAG CCGAGTAGTG TTGGCTCCCG 300
AAAGGCCTTG TGCTACTGCC TGATAGGCTG CTTGCCAGTG CCCCAGGAGG TCTCGTAGAC 360
CGTGCATC ATG AGC ACA AAT CCA AAA CCC CAA AGA AAA ATC AAA CGT AAC 410
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Ile Lys Arg Asn
1 5 10
ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTT AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC 458
Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile
15 20 25 30
GTT GGT CGA GTT TAC CTC TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT CTC 506
Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val
35 40 45
CGC CGC ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG CCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA 554
Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Pro Gln Pro Arg Gly Arg Arg

```

50	55	60	
CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CAA CCC GAG GGT AGG GCC TGG GCT CAG			602
Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln			
65	70	75	
CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAT GAG GCG TTG GGG TGG GCA			650
Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala			
80	85	90	
GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC TCC CGG CCT AGT TGG GGC CCC ACG			698
Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr			
95	100	105	110
GAC CCC CGG CCT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAG GTC ATC GAT ACC CTC			746
Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu			
115	120	125	
ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GGC TAC ATT CCG CTC GTC GGC GCC			794
Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala			
130	135	140	
CCC CTA GGG GCG GCT GCC AGG GCT CTA GCG CAT GGC GTC CCG GTT CTG			842
Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu			
145	150	155	
GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGC AAT CTG CCT GGT TGC TCC TTT			890
Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe			
160	165	170	
TCT ATC TTC CTT TTG GCT TTG CTG TCC TGT TTG ACC ATC CCA GCT TCC			938
Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser			
175	180	185	190
GCC TAC CAA GTG CGC AAC GCG TCC GGG GTG TAC CAT GTC ACG AAC GAC			986
Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ala Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp			
195	200	205	
TGC TCC AAC TCA AGT ATT GTG TAT GAG GCG GCG GAC GTG ATT ATG CAC			1034
Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His			
210	215	220	
ACC CCC GGG TGC GTG CCC TGC GTC CCG GAG AAC AAT TCC TCC CGC TGC			1082
Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys			
225	230	235	
TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTT GCG GCC AGG AAC AGC AGC ATC CCC			1130
Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro			
240	245	250	
ACT ACG ACA ATA CGG CGT CAT GTC GAC TTG CTC GTT GGC GCA GCT GCT			1178
Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala			
255	260	265	270
CTC TGT TCC GCT ATG TAT GTG GCG GAT TTT TGC GGA TCT GTT TTC CTC			1226
Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Phe Cys Gly Ser Val Phe Leu			
275	280	285	
GTC TCC CAG CTG TTC ACT TTC TCA CCT CGC CCG TAT GAG ACG GTG CAA			1274
Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln			
290	295	300	
GAC TGC AAT TGC TCA ATC TAT CCC GCG CAT GTA TCA GGC CAT CGC ATG			1322
Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met			
305	310	315	
GCT TGG GAT ATG ATA ATG AAT-TGG TCA CCT ACA ACA GCC CTA GTC GTA			1370

```

Ala Trp Asp Met Ile Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val
  320                      325                      330
TCG CAG CTA CTC CGG ATC CCA CAA GCC GTG GTG GAT ATG GTC GCA GGG 1418
Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly
  335                      340                      345                      350
GCC CAC TGG GGA GTC CTC GCG GCC CTT GCC TAC TAT TCC ATG GTC GCG 1466
Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly
                      355                      360                      365
AAC TGG GCT AAG GTC TTG CTT CTC ATG CTC CTC TTC GCC GGT GTT GAC 1514
Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp
                      370                      375                      380
GGG GCG ACC CAC GTC ACA GGG GGG AAG GTA GCC TAC ACC ACC CAG GCG 1562
Gly Gly Thr His Val Thr Gly Gly Lys Val Ala Tyr Thr Thr Gln Gly
                      385                      390                      395
TTT ACA TCC TTC TTT TCA CGA GCG CCG TCT CAG AAA ATC CAA CTT GTA 1610
Phe Thr Ser Phe Phe Ser Arg Gly Pro Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val
                      400                      405                      410
AAC ACT AAC GGC AGC TGG CAC ATC AAT AGG ACT GCC CTC AAT TGC AAT 1658
Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn
                      415                      420                      425                      430
GAC TCC CTT AAC ACC GGG TTC CTT GCC GCG CTG TTC TAC ACC CAC AGC 1706
Asp Ser Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr His Ser
                      435                      440                      445
TTC AAC GCG TCC GGA TGT CCG GAG CGT ATG GCC GGT TGC CGC CCC ATT 1754
Phe Asn Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Gly Cys Arg Pro Ile
                      450                      455                      460
GAC GAG TTC GCT CAG GCG TGG GGT CCC ATC ACT CAT GTT GTG CCT AAC 1802
Asp Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Asn
                      465                      470                      475
ATC TCG GAC CAG AGG CCC TAT TGC TGG CAC TAC GCG CCT CGA CCG TGT 1850
Ile Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys
                      480                      485                      490
GGT ATC GTA CCC GCG TCG CAG GTC TGT GGT CCG GTC TAT TGC TTC ACC 1898
Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr
                      495                      500                      505                      510
CCA AGC CCT GTT GTC GTG GGG ACC ACC GAT CGT TTC GCG GCC CCC ACG 1946
Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Ala Pro Thr
                      515                      520                      525
TAC AAC TCG GGA AAC AAT GAG ACC GAT GTC CTA CTC CTC AAC AAC ACA 1994
Tyr Asn Trp Gly Asn Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr
                      530                      535                      540
CGG CCG CCG CAG GCC AAC TGG TTC GGT TGT ACC TCG ATG 2033
Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
                      545                      550                      555

```

【0070】配列番号：2

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列

CGCGCGCGCG CGCGC

【0071】配列番号：3

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCG

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

16

【0072】配列番号：4

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCG

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

17

【0073】配列番号：5

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCG

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

18

【0074】配列番号：6

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCGCG

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

19

【0075】配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCGCG

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

20

【0076】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCGCG C

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

21

【0077】配列番号：9

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCGCG CG

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

22

【0078】配列番号：10

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCGCGCGCG CGCGCGCGCG CGC

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

23

【0079】配列番号：11

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

24

【0080】配列番号 : 12

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGG

25

【0081】配列番号 : 13

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGG

26

【0082】配列番号 : 14

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGG

27

【0083】配列番号 : 15

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGG

28

【0084】配列番号 : 16

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGG

29

【0085】配列番号 : 17

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG

30

【0086】配列番号 : 18

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

20

【0087】配列番号 : 19

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

アンチセンス : Yes

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

配列	TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT	20
【0088】配列番号：20	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：17	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	GTAAAACGAC GCCCACT	17
【0089】配列番号：21	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：17	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	CAGCAAACAG CTATGAC	17
【0090】配列番号：22	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：16	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	CAGATCTGCA AGCTTG	16
【0091】配列番号：23	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：17	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	CAGCAAACAG CTATGAC	17
【0092】配列番号：24	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	GAATAGTTTT TCAATTTTTA CG	22
【0093】配列番号：25	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	CGTAAAAATT GAAAACTAT TC	22
【0094】配列番号：26	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：17	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	GTAAAACGAC GCCCACT	17
【0095】配列番号：27	鎖の数：二本鎖	
配列の長さ：40	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	GATCCAAAAA TTGAAAAACT AGTCTAATTT ATTGCACGGA	40
【0096】配列番号：28	鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：25	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	配列の種類：他の核酸	合成DNA
配列	CGAAGCTTGC CAGCCCCCTG ATGGG	25
【0097】配列番号：29	配列の型：核酸	
配列の長さ：28	鎖の数：一本鎖	

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGGATCCCC GAAGCTGGGA TCGTCAAC

28

【0098】配列番号：30

配列の長さ：2360

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源：Vaccinia virus

直接の起源：pHASE

配列

TCGACGATTG TTCATGATGG CAAGATTTAT ATATCTGGAG GTTACAACAA TAGTACTGTA 60
 GTTAATGTAA TATCGAATCT AGTCCTTAGC TATAATCCGA TATATGATGA ATGGACCAAAA 120
 TTATCATCAT TAAACATTCC TAGAATTAAT CCCGCTCTAT GGTCAGCGCA TAATAAATTA 180
 TATGTAGGAG GAGGAATATC TGATCATGTT CGAACTAATA CATCTGAAAC ATACGATAAA 240
 GAAAAAGATT GTTGGACATT GGATAATGCT CACGTGTTAC CACGCAATTA TATAATGTAT 300
 AAATGCCAAC CGATTAAACA TAAATATCCA TTGGAAAAAA CACTACAC GAATGATTTT 360
 CTAAAGTATT TGGAAAGTTT TATAGTGTAG TGATAGAACA AAATACATAA TTTTGTAAAA 420
 ATAAATCACT TTTTATACTA ATATGACACG ATTACCAATA CTTTGTGTAC TAATATCATT 480
 AGTATACGCT ACACCTTTTC CTCAGACATC TAAAAAATA GGTGATGATG CAACTCTATC 540
 ATGTAATCGA AATAATACAA ATGACTACGT TGTATGACT CTTTGGTATA AGGAGCCCAA 600
 TTCCATTATT CTTTGTAGCTG CTAAGAGCGA CGTCTTGTAT TTTGATAATT ATACCAAGGA 660
 TAAAATATCT TACGACTCTC CATACGATGA TCTAGTTACA ACTATCACAA TTAATCATT 720
 GACTGCTAGA GATGCCGTA CTTATGTATG TGCATTCTTT ATGACATCAA CTACAAATGA 780
 CACTGATAAA GTAGATTATG AAGAATACTC CACAGACTTG ATTGTAAATA CAGACTGTA 840
 ATCGACTATA GACATAATAC TATCTGGATC TACACATTCA CCAGAACTA GCTAGTTCTG 900
 AGAAACCAGA GGATATAGAT AATTTTAATT GCTCGTCGGT ATTCGAAATC GGCTCGACAT 960
 CTATATACTA TATACTAATA CCAATACTCA AGACTACGAA ACTGATACAA TCTCTTATCA 1020
 TGTGGGTAAT GTTCTCGATG TCGATAGCCA TATGCCCGGT AGTTGCGATA TACATAAACT 1080
 GATCACTAAT TCCAAACCCA CCCACTTTTT ATAGTAAGTT TTTCACCCAT AAATAATAAA 1140
 TACAATAATT AATTTCTCGT AAAAAATGAA AACTATTCT AATTTATTGC ACGGTAAGGA 1200
 AGTAGAATCA TAAAGAACAG TCACTCTAGA GGATCCAAAA ATTGAAAAAC TACTCTAATT 1260
 TATTGCACGG AGATCCAAAA ATTGAAAAAC TACTCTAATT TATTGCACGG AGATCCAAAA 1320
 ATTGAAAAAC TACTCTAATT TATTGCACGG AGATCCAAAA ATTGAAAAAC TACTCTAATT 1380
 TATTGCACGG AGATCCAAAA ATTGAAAAAC TACTCTAATT TATTGCACGG AGATCCAAAA 1440
 ATTGAAAAAC TACTCTAATT TATTGCACGG AGATCTGCAA GCTTGGGTA CCGAGCTCGA 1500
 ATTGACTCC GGAACCAATT ACTGATAATC TAGAAGATCA TACAGACACC GTCACATACA 1560
 CTAGCTAGTG ATACCATTAA TACAGTAAGT GCATCATCTG GAGAATCCAC AACAGACGAG 1620
 ACTCCGAAC CAATTACTGA TAAAGAAGAA GATCATAACG TCACAGACAC TGTCTCATAC 1680
 ACTACAGTAA GTACATCATC TGAATTGTC ACTACTAAAT CAACCACCGA TGATCGGGAT 1740
 CTTTATGATA CGTACAATGA TAATGATACA GTACCACCAA CTAAGTGTAG CGGTAGTACA 1800
 ACCTCTATTA GCAATTATAA AACCAAGGAC TTTGTAGAAA TATTGCTAT TACCGCATT 1860
 ATTATATTGT CGGCCGTGGC AATATTCTGT ATTACATATT ATATATATAA TAAACGTTCA 1920
 CGTAAATACA AAACAGAGAA CAAAGTCTAG ATTTTGTACT TACATAAATG TCTGGGATAG 1980
 TAAAATCTAT CATATTGAGC GGACCATCTG GTTCAGGAAA GACAGCCATA GCCAAAAGAC 2040
 TATGGGAATA TATTGGATT TGTGCTGTC CATACCACTA GATTTCCTCG TCCTATGGAA 2100
 CGAGAAGGTG TCGATTACCA TTACGTTAAC AGAGAGGCCA TCTGGAAGCG AATAGCCGCC 2160
 GGAACTTTT TACAACATAC TGACTTTTGA GGAATATTT ACGGAAGTTC TAAAGTCTCT 2220
 GTGAATACAG CCGCTATTAA TAATCGTATT TGTGTGATGG ATCTAAACAT CGATCGCGTT 2280
 AGAAGTCTTA AAAATACGTA CCTAATGCCT TACTCGGTGT ATATAAGACC TACCTCTCTT 2340
 AAAATGTTG AGACCAAGCT 2360

【0099】配列番号：31

配列の長さ：4987

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

luciferase gene

起源：Vaccinia virus, Hepatitis C virus, Firefly

直接の起源：pHA5CL

配列

```

TCGACGATTC TTCATGATCG CAAGATTTAT ATATCTGGAG GTTACAACAA TAGTAGTCTA   60
GTTAATGTAA TATCGAATCT AGTCCTTAGC TATAATCCGA TATATGATGA ATGGACCAAA   120
TTATCATCAT TAAACATTCC TAGAATTAAT CCCGCTCTAT GGTACAGCGA TAATAAATTA   180
TATGTAGGAG GAGGAATATC TGATCATGTT CGAACTAATA CATCTGAAAC ATACGATAAA   240
GAAAAAGATT GTTGGACATT GGATAATGCT CACGTGTTAC CACGCAATTA TATAATGTAT   300
AAATGCCAAC CGATTAAACA TAAATATCCA TTGGAACAAA CACAGTACAC GAATGATTTT   360
CTAAAGTATT TCGAAAGTTT TATAGCTACT TCATAGAACA AAATACATAA TTTTGTAAAA   420
ATAAATCACT TTTTATACTA ATATGACACG ATTACCAATA CTTTGTGTTAC TAATATCATT   480
AGTATACGCT ACACCTTTTC CTCAGACATC TAAAAAATA GGTGATGATG CAACTCTATC   540
ATGTAATCGA AATAATACAA ATGACTACGT TGTATGACT GCTTGGTATA AGGAGCCCAA   600
TTCCATTATT CTTTGTAGCTG CTAAAAGCGA CGTCTGTAT TTTGATAATT ATACCAAGGA   660
TAAATATCTT TACGACTCTC CATACGATGA TCTAGTTACA ACTATCACA TTAATCATT   720
GACTGCTAGA GATGCCGGTA CTTATGTATG TGCATTCTTT ATGACATCAA CTACAAATGA   780
CACTGATAAA GTAGATTATC AAGAATACTC CACAGAGTTG ATTGTAAATA CAGATAGTGA   840
ATCGACTATA GACATAATAC TATCTGGATC TACACATTCA CCAGAACTA GCTACTTCTG   900
AGAAACCAGA GGATATAGAT AATTTTAATT GCTCGTCGGT ATTCCAAATC CGGTCCACAT   960
CTATATACTA TATAGTAATA CCAATACTCA AGACTACGAA ACTGATACAA TCTCTTATCA  1020
TGTGGCTAAT GTTCTCGATC TCGATAGCCA TATGCCCGGT AGTTCCGATA TACATAAACT  1080
GATCACTAAT TCCAAACCCA CCCACTTTTT ATAGTAAGTT TTTCACCCAT AAATAATAAA  1140
TACAATAATT AATTTCTCGT AAAAATTGAA AAATATTCTT AATTTATTGC ACGGTAAGGA  1200
AGTAGAATCA TAAAGAACAG TGAATCTAGA GGATCCAAAA ATTGAAAAAC TAGTCTAATT  1260
TATTGCACGG AGATCCAAAA ATTGAAAAAC TAGTCTAATT TATTGCACGG AGATCCAAAA  1320
ATTGAAAAAC TAGTCTAATT TATTGCACGG AGATCCAAAA ATTGAAAAAC TAGTCTAATT  1380
TATTGCACGG AGATCCAAAA ATTGAAAAAC TAGTCTAATT TATTGCACGG AGATCCAAAA  1440
ATTGAAAAAC TAGTCTAATT TATTGCACGG AGATCTGCAA GCTTCCAGC CCCCTGATGG  1500
GGCGGACACT CCACCATAGA TCACTCCCTC GTGAGGAACT ACTGTCTTCA CGCAGAAACC  1560
GTCTAGCCAT GCGGTAGTA TGAATGCTGT GCAGCCTCCA GGACCCCGCC TCCCGGAGCA  1620
GCCATAGTGG TCTGCGGAAC CGGTGAGTAC ACCGGAATTG CCAGGACGAC CGGTCTCTTT  1680
CTTGGATCAA CCCGCTCAAT GCCTGCAGAT TTGGGCGTGC CCCCGCGAGA CTGCTAGCCG  1740
AGTAGTCTTG GGTCCGGAAG GGCCTTCTGG TACTGCCTGA TAGGGTGCTT CCGACTGCCC  1800
CGGGAGCTCT CGTAGACCGT GCATC ATG AGC ACA AAT CCA AAA CCC CAA AGA  1852
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg
      1              5
AAA ATC AAA CGT AAC ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTT AAG TTC CCG   1900
Lys Ile Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro
      10              15              20              25
GGC GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA GTT TAC CTC TTG CCG CGC AGG GGC   1948
Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly
      30              35              40
CCC AGG TTG GCT GTG CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG CCG CAA   1996
Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Pro Gln
      45              50              55
CCT CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CAA CCC GAG GGT   2044
Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly
      60              65              70
AGG GCC TGG GCT CAG CCC GCG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAT GAG   2092
Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu

```

75	80	85	
GGC TTG GGG TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC TCC CGG CCT			2140
Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro			
90	95	100	105
ACT TGG GGC CCC ACC GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAG			2188
Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
	110	115	120
GTC ATC GAT ACC CTC ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GCG TAC ATT			2236
Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile			
	125	130	135
CCG CTC GTC GGC GCC CCC CTA GGG GGC GCT GCC AGG GCT CTA GCG CAT			2284
Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His			
	140	145	150
GGC GTC CGG GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAT CTG			2332
Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu			
	155	160	165
CCT GGT TGC TCC TTT TCT ATC TTC CTT TTG GCT TTG CTG TCC TGT TTG			2380
Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu			
	170	175	180
ACC ATC CCA GCT TCC GGG ATC CAA ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG			2428
Thr Ile Pro Ala Ser Gly Ile Gln Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys			
	190	195	200
AAA GGC CCG GCG CCA TTC TAT CCT CTA GAG GAT GGA ACC GCT GGA GAC			2476
Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu			
	205	210	215
CAA CTG CAT AAG GCT ATG AAG AGA TAC GCC CTG GTT CCT GGA ACA ATT			2524
Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile			
	220	225	230
GCT TTT ACA GAT GCA CAT ATC GAG GTG AAC ATC ACC TAC CCG GAA TAC			2572
Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr			
	235	240	245
TTC GAA ATG TCC GTT CGG TTG GCA GAA GCT ATG AAA CGA TAT GGG CTG			2620
Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu			
	250	255	260
AAT ACA AAT CAC AGA ATC GTC GTA TGC AGT GAA AAC TCT CTT CAA TTC			2668
Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe			
	270	275	280
TTT ATG CCC GTG TTG GGC GCG TTA TTT ATC GGA GTT GCA GTT GCG CCC			2716
Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro			
	285	290	295
GCG AAC GAC ATT TAT AAT GAA CGT GAA TTG CTC AAC AGT ATG AAC ATT			2764
Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile			
	300	305	310
TCG CAG CCT ACC GTA GTG TTT GTT TCC AAA AAG GCG TTG CAA AAA ATT			2812
Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile			
	315	320	325
TTG AAC CTG CAA AAA AAA TTA CCA ATA ATC CAG AAA ATT ATT ATC ATG			2860
Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met			
	330	335	340
GAT TCT AAA ACC GAT TAC CAG TGA TTT CAG TCG ATG TAC ACC TTC GTC			2908

Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val	
350 355 360	
ACA TCT CAT CTA CCT CCC GGT TTT AAT GAA TAC GAT TTT GTA CCA GAG	2956
Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu	
365 370 375	
TCC TTT GAT CGT GAC AAA ACA ATT GCA CTG ATA ATG AAT TCC TCT GGA	3004
Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly	
380 385 390	
TCT ACT GGG TTA CCT AAG GGT CTG GCC CTT CCG CAT ACA ACT GCC TGC	3052
Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys	
395 400 405	
CTC AGA TTC TCG CAT GCC AGA GAT CCT ATT TTT GCG AAT CAA ATC ATT	3100
Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile	
410 415 420 425	
Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val Val	
Pro Phe His His Gly Phe Gly	
430 435 440	
ATG TTT ACT ACA CTC GGA TAT TTG ATA TGT GGA TTT CGA CTC CTC TTA	3196
Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu	
445 450 455	
ATG TAT AGA TTT GAA GAA GAG CTG TTT TTA CGA TCC CTT CAG GAT TAC	3244
Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr	
460 465 470	
AAA ATT CAA AGT GCG TTG CTA GTA CCA ACC CTA TTT TCA TTC TTC GCC	3292
Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala	
475 480 485	
AAA AGC ACT CTG ATT GAC AAA TAC GAT TTA TCT AAT TTA CAC GAA ATT	3340
Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile	
490 495 500 505	
GCT TCT GGG GGC GCA CCT CTT TCG AAA GAA GTC GGG GAA GCG GTT GCA	3388
Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala	
510 515 520	
AAA CGC TTC CAT CTT CCA GGG ATA CGA CAA GGA TAT GGG CTC ACT GAG	3436
Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu	
525 530 535	
ACT ACA TCA GCT ATT CTG ATT ACA CCC GAG GGC GAT GAT AAA CCG GGC	3484
Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly	
540 545 550	
GCG GTC GGT AAA GTT GTT CCA TTT TTT GAA GCG AAG GTT GTG GAT CTG	3532
Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu	
555 560 565	
GAT ACC GGC AAA ACG CTG GCG GTT AAT CAG AGA GGC GAA TTA TGT GTC	3580
Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val	
570 575 580 585	
AGA GGA CCT ATG ATT ATG TCC GGT TAT GTA AAC AAT CCG GAA GCG ACC	3628
Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr	
590 595 600	
AAC GCC TTG ATT GAC AAG CAT GGA TGG CTA CAT TCT GGA GAC ATA GCT	3676
Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala	
605 610 615	

TAC TGG GAC GAA GAC GAA CAC TTC TTC ATA GTT GAC CTC TTG AAG TCT	3724
Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe Phe Ile Val Asp Leu Leu Lys Ser	
620 625 630	
TTA ATT AAA TAC AAA GGA TAT CAG GTG GCC CCC GCT GAA TTG GAA TCG	3772
Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser	
635 640 645	
ATA TTG TTA CAA CAC CCC AAC ATC TTC GAC GCG GGC GTG GCA GGT CTT	3820
Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu	
650 655 660 665	
CCC GAC GAT GAC GCC GGT GAA CTT CCC GCC GCC GTT GTT GTT TTG GAG	3868
Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu	
670 675 680	
CAC GGA AAG ACG ATC ACC GAA AAA GAC ATC CTC CAT TAC GTC GCC AGT	3916
His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser	
685 690 695	
CAA GTA ACA ACC GCG AAA AAG TTG CGC GGA GGA GTT GTG TTT GTG GAC	3964
Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp	
700 705 710	
GAA GTA CCG AAA GGT CTT ACC GGA AAA CTC GAC GCA AGA AAA ATC AGA	4012
Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg	
715 720 725	
GAG ATC CTC ATA AAG GCC AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG TAA AAT	4060
Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu Stop	
730 735 740	
GTAAGTGTAT TCAGCGATGA CGAAATTCTT AGCTATTGTA ATCCTCCGAG GCCTCGAGGT	4120
CGACGAATTC CGACTCCGGA ACCAATTACT GATAATGTAG AAGATCATAAC AGACACCGTC	4180
ACATACACTA GCTAGTGATA GCATTAATAC AGTAAGTGCA TCATCTGGAG AATCCACAAC	4240
AGACGAGACT CCGGAACCAA TTAGTGATAA AGAAGAAGAT CATACACTCA CAGACACTGT	4300
CTCATACACT ACAGTAAGTA CATCATCTCG AATTGTCACT ACTAAATCAA CCACCGATCA	4360
TGCGGATCTT TATGATACGT ACAATGATAA TGATACAGTA CCACCAACTA CTGTAGCGCG	4420
TAGTACAACC TCTATTAGCA ATTATAAAAC CAAGGACTTT GTAGAAATAT TTGCTATTAC	4480
CGCATTAATT ATATTGTCGG CCGTGGCAAT ATTCTGTATT ACATATTATA TATATAATAA	4540
ACGTTACCGT AAATACAAAA CAGAGAACAA AGTCTAGATT TTTGACTTAC ATAAATGTCT	4600
GGGATAGTAA AATCTATCAT ATTGACCGGA CCATCTGTT CAGGAAACAC ACCCATAGCC	4660
AAAAGACTAT CGGAATATAT TTGGATTTCT GGTGTCCCAT ACCACTAGAT TTCCTCGTCC	4720
TATGGAACGA GAAGCTGTCG ATTACCATTA CGTTAACAGA GAGGCCATCT GGAAGCGAAT	4780
AGCCGCCGGA AACTTTCTAG AACATACTGA GTTTTACGA AATATTTACG GAACTTCTAA	4840
AACTGCTGTC AATACAGCGG CTATTAATAA TCGTATTGCT GTGATGGATC TAAACATCGA	4900
TGGCGTTAGA AGTCTTAAAA ATACGTACCT AATGCCTTAC TCGGTGTATA TAAGACCTAC	4960
CTCTCTTAAA ATGCTTGAGA CCAAGCT	4987

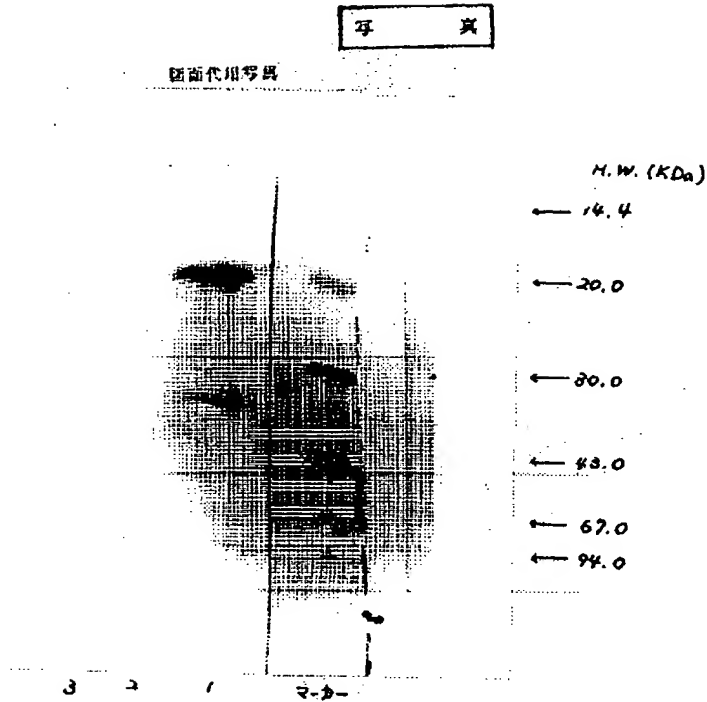
【図面の簡単な説明】

【図1】組換えワクシニアウイルスにより発現されたHCVコア蛋白をウエスタンブロッティングにて検出した結果を表す電気泳動パターンの図面である。図中、レーン1は組換えワクシニアウイルスrVV5CLを、レーン2および3はワイルドタイプのワクシニアウイルスの結果をそれぞれ表す。

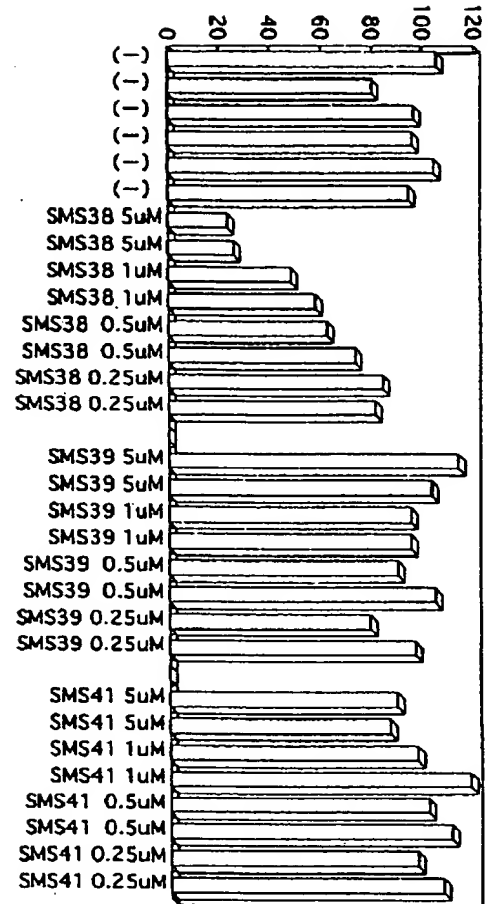
【図2】組換えワクシニアウイルスrVV5CLをWR

L68株に感染させた後に本発明の抗ウイルス剤を0.25、0.5、1、5 μ Mとなるように添加したときの、発現されたルシフェラーゼの酵素量を測定して表した図面である。図中、(ー)とは抗ウイルス剤無添加の場合の結果を表し、縦軸は(ー)のルシフェラーゼ酵素量($\times 10^{-20}$ mol/8 μ M)の平均値を100としたときの相対値を表す。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成6年6月3日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】組換えワクシニアウイルスにより発現されたHCVコア蛋白をウエスタンブロッティングにて検出した結果を電気泳動パターンで表した図面に代わる写真である。図中、レーン1は組換えワクシニアウイルス rVV5CLを、レーン2および3はワイルドタイプのワクシニアウイルスの結果をそれぞれ表す。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

// C 0 7 H 21/04

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z